



ТАРАСЕНКО Татьяна Андреевна

**ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ
МИТОХОНДРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ИМПОРТЕ ДНК**

03.01.05 физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

Кулинченко Милана Вячеславовна
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Щербаков Дмитрий Юрьевич
доктор биологических наук,
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Лимнологический институт Сибирского
отделения Российской академии наук,
заведующий лабораторией
геносистематики

Мазунин Илья Олегович
кандидат биологических наук, Центр
наук о жизни Сколковского института
науки и технологий

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «17» декабря 2019 года в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510-754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Д 003.047.01,

кандидат биологических наук

Акимова Галина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что для митохондриального генома растений характерна удивительно высокая, в сравнении с другими геномами, частота событий горизонтального и внутриклеточного переносов (Sanchez-Puerta, 2014). Высока вероятность того, что на структуру и динамику митохондриального генома растений значительное влияние может оказывать наличие у митохондрий природной компетентности – способности поглощать ДНК из окружающей среды. Этот феномен первоначально был продемонстрирован для растений (Koulintchenko et al., 2003; Konstantinov et al., 2016), но в дальнейшем был описан и для митохондрий млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Митохондрии также импортируют РНК, главным образом тРНК.

В отличие от импорта белков и тРНК, биологическая роль и молекулярный механизм импорта ДНК в митохондрии до сих пор остаются недостаточно изученными. Согласно более ранним исследованиям (Koulintchenko et al., 2003; Delage et al., 2003; Weber-Lotfi et al., 2009) основным каналом импорта ДНК и тРНК в митохондрии растений на уровне внешней мембраны является VDAC. В дальнейших исследованиях импорта тРНК было показано, что у растений в этот процесс вовлечены также и компоненты аппарата импорта белков (Campo et al., 2017; Verechshagina et al., 2018). Протеомный анализ изменения интенсивности флуоресценции меченых белков в присутствии ДНК, позволил выявить несколько мембранных белков, обладающих потенциальной способностью к участию в импорте ДНК в митохондрии арабидопсиса (Weber-Lotfi et al., 2015). Один из этих белков, предшественник β -субъединицы АТФ-синтазы, на уровне внешней мембраны может взаимодействовать с VDAC в процессе связывания ДНК; другой белок, субъединица комплекса I, CuBP, возможно, выполняет рецепторную функцию в межмембранном пространстве (Weber-Lotfi et al., 2015). Перенос ДНК через внутреннюю мембрану в матрикс остается малоизученным и может происходить в растениях и у млекопитающих с участием различных механизмов: ингибиторы белка-переносчика внутренней мембраны адениннуклеотидтранслоказы блокируют импорт ДНК в растениях, но не в митохондриях млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006).

В исследовании (Weber-Lotfi et al., 2015) были представлены данные о сложном характере взаимодействия совместного импорта ДНК разной длины и тРНК, указывая на то, что транспорт ДНК в митохондрии растений может происходить посредством нескольких альтернативных механизмов, при участии разнообразных белковых комплексов. Мы полагаем, что перенос ДНК в митохондрии происходит через этапы рецепции молекулы нуклеиновой кислоты поверхностными белками внешней митохондриальной мембраны и ее последующей транслокации через белковый канал или пору в двойной мембране. Исходя из предположения о том, что транспорт ДНК в митохондрии происходит посредством не одного, а нескольких мембранных каналов, этот процесс может иметь сложную кинетическую зависимость субстрат-белкового взаимодействия.

Кроме того, в настоящее время хорошо известно, что митохондрии представляют собой гетерогенную популяцию клеточных органелл, т.е. существует их структурная и функциональная неоднородность в растительной или животной клетке (Lund et al., 1958; Bain et al., 1964; Berl and Clarke, 1969; Solomos et al., 1972; Malhotra and Spencer, 1973; Белякович, 1990; Dai et al., 1998; Logan et al., 2001; Шишмаков и др., 2004; Logan, 2006; Howell et al., 2006; Petrusa et al., 2008; Бегунова и Векшин, 2015). К критериям различия субпопуляций митохондрий относят физиологическое состояние, ферментативную активность, митохондриальный трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), копийность митохондриальной ДНК, а также импорт белков, жизненно необходимых для нормального функционирования органеллы. Однако, никаких данных о связи процесса импорта ДНК в митохондрии с гетерогенностью митохондриальной популяции в настоящее время не существует.

Важно отметить, что все исследования импорта ДНК в митохондрии животных и растений, проводившиеся до настоящего времени, осуществлялись на уровне изолированных митохондрий. До настоящего момента остается неясным, происходит ли импорт на уровне целых клеток и сохраняются ли *in vivo* закономерности этого процесса, продемонстрированные ранее *in organello*. Разработка системы, позволяющей изучать механизмы переноса молекул ДНК из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в целых клетках, помимо фундаментальной значимости, может послужить отправной точкой для осуществления трансформации мт-генома высших растений, чрезвычайно важной и, на настоящий момент, нерешенной задачи.

Исходя из вышесказанного, **цель настоящей работы** – провести исследование роли факторов, белковой и небелковой природы, оказывающих влияние на организацию транспортной системы растительных митохондрий, в импорте ДНК разной длины. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать комплексный подход, позволяющий изучать процесс импорта ДНК в митохондрии *in organello* и *in vivo* (с использованием системы трансформации протопластов *A. thaliana*).

2. Изучить кинетические характеристики импорта ДНК разной длины в растительные митохондрии.

3. С использованием инсерционных мутантов *A. thaliana* исследовать роль в импорте ДНК белков, способных к транспортной активности во внешней митохондриальной мембране (изоформ VDAC, TSPO, OM47), потенциально участвующих в формировании межоргanelльных контактных сайтов (MIC60), участвующих в процессах деления/слияния митохондрий (DRP3A и DRP3B).

4. Изучить возможное влияние структурно-функциональных особенностей митохондриальных популяций в растительной клетке на процесс импорта ДНК.

Научная новизна

В представленной работе с использованием двух систем – *in organello* и *in vivo* – впервые исследована роль белков-переносчиков внешней митохондриальной мембраны *A.thaliana*, а именно: 1) изоформ VDAC, митохондриального порина (VDAC1, VDAC2, VDAC3, VDAC4); 2) белка внешней мембраны растительных митохондрий TSPO; 3) субъединицы MIC60, локализуемой во внутренней митохондриальной мембране; 4) белка внешней митохондриальной мембраны OM47; 5) субъединиц ассоциированного с внешней мембраной митохондрий белка DRP3, участника процесса деления митохондрий - DRP3A и DRP3B. Показано, что отсутствие любой из изоформ VDAC, за исключением VDAC3, приводит к значительному усилению процесса импорта ДНК, возможно вследствие компенсаторного эффекта, вызванного повышением содержания в мембране изоформы VDAC3 и/или структурных перестроек митохондриальной мембраны. Показано, что белок TSPO не является участником основного механизма, транслоцирующего ДНК в митохондрии, но может быть частью какого-то дополнительного транспортного пути, в случае использования для импорта повышенных концентраций ДНК-субстрата. Для белка внешней мембраны OM47, имеющего анион-транспортную активность, белка внутренней мембраны MIC60, потенциально участвующего в формировании контактов митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭР), и белка DRP3, играющего роль в делении митохондрий, роли в импорте ДНК не установлено.

Исследована кинетическая зависимость процесса импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* от размера и количества импортируемого ДНК-субстрата. Показано, что зависимость импорта от количества ДНК-субстрата имеет различный характер для ДНК разной длины: 1) линейный для ДНК малой длины; 2) ступенчатый для ДНК средней длины. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что импорт ДНК средней длины происходит в митохондрии посредством нескольких механизмов.

Впервые исследовано влияние на эффективность импорта ДНК структурно-функциональных особенностей митохондрий, формирующих разные митохондриальные

популяции. Показано, что митохондрии, обладающие менее сформированной системой внутренних мембран, проявляют более выраженную способность к импорту ДНК.

В диссертационной работе представлен новый подход к изучению импорта ДНК с использованием системы *in vivo*. Показано, что 1) ДНК эффективно транслоцируется из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в протопластах арабидопсиса; 2) эффективность импорта ДНК *in vivo* значительно выше импорта ДНК в системе *in organello*, что позволяет предположить существование различных клеточных факторов, способствующих эффективному транспорту ДНК в митохондрии.

Методология и методы исследования

В работе были использованы следующие методы и подходы: выделение и очистка изолированных митохондрий четырех растительных источников (*Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Brassica rapa*, *Zea mays*), электронная микроскопия, оценка функциональной активности митохондрий, электрофорез митохондриальных белков в полиакриламидном геле, определение активности дыхательных комплексов методом BN-PAGE, получение флуоресцентно меченых и «холодных» немеченых ДНК-субстратов импорта при помощи амплификации в ПЦР, метод ПЦР-генотипирования для получения гомозиготных линий арабидопсиса, проведение импорта ДНК в митохондрии *in organello*, импорт ДНК в растительные митохондрии в системе *in vivo*, экстракция нуклеиновых кислот, флуоресцентный метод анализа импорта ДНК, количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), синтез кДНК, обратнo-транскриптная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), статистическая обработка полученных данных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые данные о факторах, влияющих на формирование транспортных систем растительных митохондрий, которые участвуют в импорте ДНК, что позволит углубить наше понимание механизма этого процесса и его значимости для митохондриальных функций в клетке. Полученные данные можно использовать не только в фундаментальных исследованиях по выяснению функций митохондриального генома у организмов разных видов, но также в работах по биотехнологии (клонирование целевых генов в митохондриях) и биомедицине (генотерапия митохондриальных болезней и болезней пожилого возраста человека).

Материалы диссертационной работы могут быть использованы в образовательных учреждениях в лекционных курсах дисциплин по физиологии и биохимии растений, а также специалистами-биологами научно-исследовательских институтов.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на III Международной Конференции молодых ученых «OpenBio» (Новосибирск, 5-6 октября, 2016 год); 10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB; Hangzhou, China, May 22 – 27, 2017); Международной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика АН СССР Д. К. Беляева «Беляевские чтения» (Новосибирск, 7-10 августа, 2017 г.); 2-й всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 22-24 мая 2018 г.); Годичном собрании ОФР-2018, научной конференции «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля, 2018 год); 11th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB; Ein Gedi, Israel, March 10-15, 2019); 5th International Scientific Conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology» (PlantGen2019) (24-29 June 2019 Novosibirsk, Russia); Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (ВОГиС; 18-22 июня 2019, Санкт-Петербург).

Основные положения, выносимые на защиту

1. При трансформации протопластов арабидопсиса ДНК поступает из цитоплазмы в митохондрии. Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях в системе изолированных митохондрий, сохраняются *in vivo*.

2. Существует несколько путей импорта ДНК в растительные митохондрии, зависящих от длины транспортируемой молекулы.
3. Отсутствие одной из изоформ VDAC в нокаут-мутантных линиях арабидопсиса приводит к структурным и функциональным изменениям митохондриальной мембраны, оказывающим существенное влияние на активность импорта ДНК в митохондрии.
4. Выявляемые при выделении митохондрий субпопуляции этих органелл обладают структурной разнородностью и различной способностью импортировать ДНК.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В работе были использованы растения арабидопсиса дикого типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia (Col-0) и линии инсерционных мутантов SALK_034653 (*vdac1*), SAIL_726_H02 (*vdac2*), SALK_127899 (*vdac3*), SALK_023908 (*vdac4*), SALK_135023 (*tspo*), SALK_007876 (*mic60*), SALK_016767 (*om47*), SALK_066958 (*drp3a-3*), SALK_046271 (*drp3b-1*), семена которых были получены из коллекции Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, USA). Гомозиготные растения изучаемых линий были получены с помощью ПЦР-генотипирования. Растения арабидопсиса, после стратификации в течение трех суток при +4 °С, выращивали при 22 °С в ростовой камере KBW-720 («Binder», Германия), в горшках, наполненных смесью почвогрунта для комнатных растений / торфа / вермикулита (2 : 1 : 3) при освещенности 150 мкмоль*м-2*с-1 и длине светового дня 16 ч. Этилированные проростки кукурузы *Zea mays* (сорт «Кубанский 250 МВ») выращивали при 29 °С в течение 4 суток в темноте. В работе были использованы также клубни картофеля *Solanum tuberosum* (сорт «Адретта») и корнеплоды репы *Brassica rapa* (сорт «Внучка»). Семена кукурузы приобретены в НПО «КОС-МАИС», Краснодар; картофель выращен на территории СИФИБР СО РАН, Иркутск; семена репы приобретены в торговой сети.

Генетическая конструкция рСК/GFP/PRmt (Koulinchenko et al., 2003), содержащая последовательность гена GFP, служила матрицей для амплификации фрагментов размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. Для получения флуоресцентного ДНК-субстрата использовали олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце флуоресцирующую группу Cy3 («Евроген», Россия). Генетическая конструкция рIR-11.6/Br-9 (получена сотрудниками лаборатории ЛГИР СИФИБР СО РАН) служила матрицей для амплификации ДНК большого размера (9 т.п.н.)

Митохондрии получали согласно описанным ранее протоколам из *Arabidopsis thaliana* (Sweetlove et al., 2007), этилированных проростков *Zea mays* (Newton and Walbot, 1985), клубней *Solanum tuberosum* и корнеплодов *Brassica rapa* (Neuburger et al., 1982). Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Очищенную фракцию митохондрий исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе *Leo 906E* («Zeiss», Германия) (Layton et al., 2004).

Анализ функциональной активности изолированных митохондрий (100 мкг белка) проводили полярографическим методом с использованием платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system («Hansatech», Великобритания). Коэффициент дыхательного контроля митохондрий определяли согласно описанному ранее протоколу (Douce and Neuburger, 1989). Интактность внешней мембраны митохондрий рассчитывали, как описано ранее (Грабельных и др., 2014).

Импорт ДНК проводили в буфере импорта, содержащем 0,4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, pH 7,0, при температуре 25 °С и постоянном покачивании (350 rpm) на термошейкере для микропробирок и ПЦР планшетов TS-100 («BioSan», Латвия) в течение 30 мин (Koulinchenko et al., 2003), объем реакции составлял 100–200 мкл. Обработку митохондрий ДНКазой проводили в буфере импорта (100 мкл) в присутствии ДНКазы I (500 мкг/мл) («Sigma», США) и 10 мМ MgCl₂ в течение 20 мин при 25 °С. Дальнейшую отмывку проводили как описано ранее (Koulinchenko et al., 2003). Для получения

митопластов внешнюю мембрану митохондрий разрушали с помощью осмотического шока: осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл 5 мМ фосфата калия, pH 7,5, инкубировали на льду 5 мин, затем осаждали и промывали в буфере, содержащем 0,3 М сахарозу, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, pH 7,2. Экстракцию ДНК из осадка митохондрий проводили с использованием буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 1 % (w/v) SDS, pH 7,5, и равного объема фенола. Нуклеиновые кислоты, содержащиеся после центрифугирования в водной фазе, осаждали этанолом в присутствии 200 мМ NaCl. Элюцию ДНК из геля проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США).

РНК экстрагировали из растительного материала при помощи TRI-Reagent («Sigma-Aldrich») согласно протоколу производителя. Для удаления возможных примесей ДНК к 8 мкл образца РНК добавляли 1 мкл 10-ти кратного буфера ДНКазы («Thermo Scientific», США), 0,5 мкл ДНКазы («Thermo Scientific»). Инкубировали 30 мин при 37 °С. Для инактивации ДНКазы добавляли 1 мкл EDTA (25 мМ) и прогревали 10 минут при 65 °С. Затем добавляли 1 мкл праймеров oligo-dT (80 пМ) («Thermo Scientific») и прогревали 5 минут при 70 °С. Инкубировали 5 мин на льду. К смеси добавляли 4 мкл 5х буфера обратной транскриптазы («Thermo Scientific»), 0,5 мкл (20 ед.) ингибитора РНКаз («Thermo Scientific»), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP («Thermo Scientific»). Инкубировали 5 мин при 37 °С. К смеси добавили 0,7 мкл (140 ед.) обратной транскриптазы RevertAid-MuIV («Thermo Scientific»). Инкубировали 60 мин при 42 °С. Инактивировали фермент инкубацией в течение 10 мин при 70 °С. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили, как описано выше. В качестве референсного гена использовали YLS8 (At5G08290) (Hong et al., 2010).

Протопласты получали из листьев *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу (Wu et al., 2009) с модификациями. Верхний слой эпидермиса удаляли с помощью липкой ленты. Куски липкой ленты с приклеившимся нижним эпидермисом и клетками мезофилла помещали на поверхность среды выделения протопластов (0,4 М маннитол, 10 мМ CaCl₂, 20 мМ KCl, 20 мМ MES, pH 5,7, 0,1 % БСА), содержащей 1 % целлюлазу и 0,25 % пектолиазу («MP Biomedicals», США) и инкубировали при легком покачивании в течение 2 ч. К отобранной суспензии протопластов добавляли 15 мл среды промывания (СП), содержащей 154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl, 5 мМ глюкозу, 2 мМ MES, pH 5,7 и центрифугировали в течение 3 мин при 100 g. Супернатант удаляли, осадок протопластов ресуспендировали в 15 мл СП и повторяли центрифугирование. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0,4 М маннитол, 15 мМ MgCl₂, 4 мМ MES, pH 5,7 из расчета 300 мкл на один образец. К суспензии протопластов добавляли раствор ДНК-субстрата (5 мкг), после чего к пробам добавляли 300 мкл раствора, содержащего 20 % (v/o) PEG (MW 2000), 0,2 М маннитол, 100 мМ CaCl₂, и инкубировали в течение 5 мин. Затем суспензию протопластов подвергали трем циклам центрифугирования в 1,5 мл СП в течение 1 мин при 100 g и 20 °С. Протопласты ресуспендировали в СП и инкубировали в течение 20 ч. Суспензию протопластов центрифугировали в течение 1 мин при 100 g. К осадку добавляли 400 мкл среды выделения митохондрий (СВ) (0,4 М сахароза, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 0,2 % БСА, 2 мМ DTT), содержащую ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл СВ. Протопласты разрушали с помощью гомогенизатора Поттера. Образцы подвергали двум циклам последовательных низко- и высокоскоростных центрифугирований: в течение 5 мин при 3000 g и в течение 7 мин при 15000 g. Осадок митохондрий ресуспендировали в 100 мкл среды обработки ДНКазой (0,4 М сахароза, 40 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,0), содержащей 0,2 % БСА, 10 мМ MgCl₂ и ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл среды и инкубировали 20 мин при 25 °С. После инкубации митохондрии подвергали двум циклам центрифугирования в СВ, содержащей 0,2 % БСА, 10 мМ ЭДТА и 10 мМ ЭГТА в течение 7 мин при 15000 g и 4 °С.

Для анализа эффективности импорта флуоресцентно меченого ДНК-субстрата пробы подвергали электрофоретическому разделению в 1 %-ном агарозном геле и сканировали при помощи Ettan™ DIGE Imager («GE Healthcare», Швеция). Количественную ПЦР проводили с использованием набора SYBR Select Master Mix

(«Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager («Bio-Rad», США).

Все процедуры проводили как минимум в трех независимых экспериментах. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне вероятности $P < 0,05$. Для обратного-транскриптной ПЦР в реальном времени статистическая обработка данных и построение диаграмм производились программой CFX Manager™ Software Version 1,6 («Bio-Rad»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченых субстратов

Радиоактивный метод анализа, активно использовавшийся во всех прежних исследованиях импорта ДНК *in organello* (Koulinchenko et al., 2003), обладает рядом недостатков (табл. 1), поэтому мы поставили задачу разработать альтернативный метод анализа импорта с помощью флуоресцентного мечения ДНК. Для этой цели мы проводили амплификацию фрагментов ДНК с использованием праймеров, содержащих на своих концах флуорофоры (рис. 1, а). Визуализация фрагмента ДНК в сканере флуоресценции показала высокую чувствительность данного метода (рис. 1, б). Кроме того, показано, что пробы не теряют своей способности к флуоресценции в течение месяца: количество детектируемой ДНК (не менее 0,5 нг) оставалось на одном уровне (рис. 1, в).

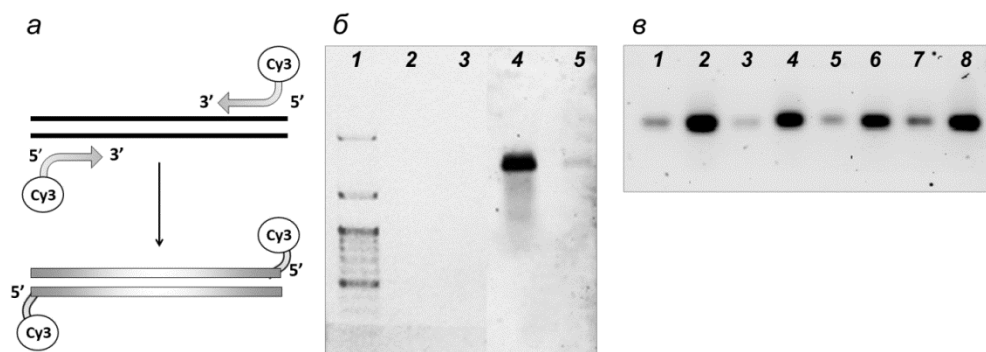


Рис. 1. Флуоресцентно меченые субстраты ДНК для импорта в митохондрии

а) Схема способа введения флуорофора Cy3 в молекулы ДНК; б) и в) визуализация флуоресцентно меченых фрагментов ДНК (852 п.н.) после электрофоретического разделения в агарозном геле; б) визуализация ДНК после окрашивания бромистым этидием (1-3) и в сканере флуоресценции (4-5); на гель нанесены 5 нг (2, 4) и 0,5 нг (3, 5) ДНК; (1) - маркер молекулярного веса ДНК; в) анализ зависимости качества флуоресцентно меченых проб ДНК от времени хранения; (1, 2) – 4х-, (3, 4) – 3х-, (5, 6) – 2х-, (7, 8) – 1-недельные пробы ДНК; на гель нанесены 1 нг (1, 3, 5, 7) и 5 нг (2, 4, 6, 8) ДНК фрагмента 852 п.н.

Ранее единственное исследование импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченых фрагментов (Jackson et al., 2014) было проведено на изолированных митохондриях человека. Импортированную в митохондрии ДНК визуализировали с помощью конфокальной микроскопии. Было показано, что меченая ДНК сохраняется после обработки ДНКазой, т.е. находится в матриксе органеллы. Однако данный метод не включал удаления внешней митохондриальной мембраны и не гарантировал избавления от ассоциированной с ней ДНК, а также не позволил различить флуоресценцию проникших в митохондрию полноразмерных фрагментов ДНК и продуктов их деградации.

Получив флуоресцентно меченые субстраты ДНК разной длины, мы изучили возможность их импорта в митохондрии трех видов растений (*A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*) (рис. 2). В ходе дальнейших экспериментов по импорту ДНК, мы убедились, что флуоресцентно меченые молекулы активно импортируются в митохондрии всех тестируемых растительных источников (рис. 2, а-в). Анализ импорта ДНК, проведенный с помощью количественной ПЦР, показал, что наличие на концах молекул флуорофоров не препятствует транслокации молекул ДНК в митохондриальный матрикс (рис. 2, г).

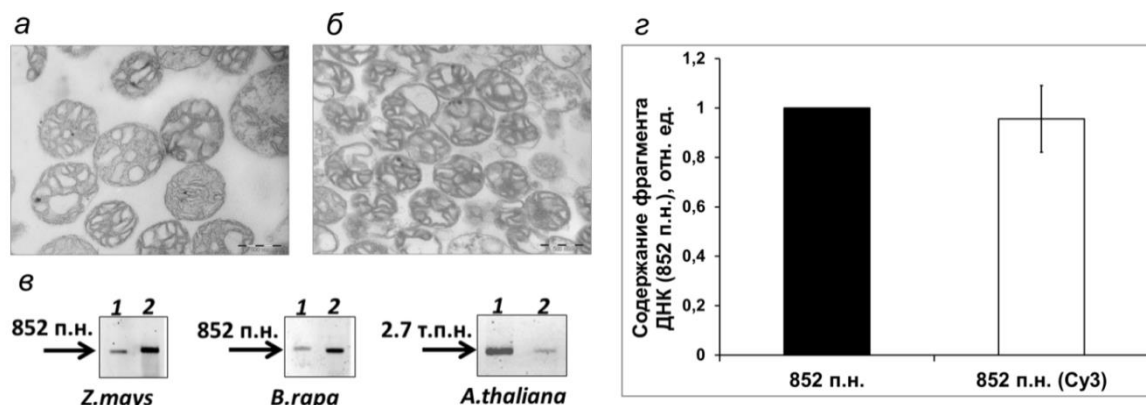


Рис. 2. Импорт меченой (Cy3) ДНК в растительные митохондрии

Митохондрии *B. rapa* (а) и *Z. mays* (б), изображения получены с помощью электронной микроскопии (масштаб 500 нм). в – Флуоресцентно меченая ДНК (0,5 мкг) размером 852 п.н. и 2,7 т.п.н. была импортирована в изолированные митохондрии *Z. mays*, *B. rapa* и *A. thaliana*. После инкубации с митохондриями, мтДНК была экстрагирована и разделена электрофоретически в агарозном геле. Дорожки: 1 – флуоресцентно меченый ДНК-субстрат до импорта, 3 нг; 2 – экстрагированный после импорта в митохондрии. г – Влияние наличия Cy3 на 5'концах фрагмента ДНК размером 852 п.н. на его импорт в митохондрии. Показано относительное количество фрагмента гена *GFP* (содержащегося в импортированной ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. На диаграмме (г) уровень импорта 852 п.н. принят за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Таким образом, для исследований митохондриального импорта ДНК можно успешно применять субстраты, полученные с помощью флуоресцентного мечения. Тем не менее, этот метод не позволяет проводить количественную оценку импортированной ДНК. Исходя из этого, в качестве еще одного методического подхода для анализа импорта ДНК в митохондрии нами был использован метод ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ), который восполнял недостатки флуоресцентного метода (табл. 1).

Таблица 1

Сопоставление преимуществ и недостатков методов анализа импорта ДНК

Критерий выбора метода	Метод анализа импорта		
	Радиоактивный метод анализа	Флуоресцентный метод анализа	ПЦР-РВ
Детекция полноразмерного фрагмента	+	+	–
Количественная оценка эффективности импорта	–	–	+
Возможность длительного хранения ДНК-субстрата без потери качества	–	+	+
Удобство и быстрота метода	–	+	+
Безопасность для здоровья	–	+	+
Применение в системе <i>in organello</i>	+	+	+
Применение в системе <i>in vivo</i>	–	–	+

Постановка метода изучения импорта ДНК в митохондриях протопластов арабидопсиса *in vivo*

Ранее природную компетентность митохондрий к поглощению ДНК, как животных, так и растений, не исследовали *in vivo*. При этом на протяжении многих лет не прекращался поиск методических подходов для осуществления трансформации митохондриального генома млекопитающих (Remacle et al., 2012; Niazi et al., 2013). Отсутствуют также сообщения и об успешной трансформации митохондрий высших растений (Verechshagina et al., 2018; Remacle et al., 2012). До настоящего момента остается неясным, происходит ли

импорт на уровне целых клеток, и сохраняются ли *in vivo* закономерности этого процесса, продемонстрированные *in organello*.

В рамках данной работы нами впервые был разработан метод изучения импорта в системе *in vivo*. Следует подчеркнуть, что это подход позволяет проводить импорт ДНК в митохондрии протопластов растительных клеток. Данный подход включает: (1) получение протопластов; (2) трансформацию полученного препарата протопластов молекулами ДНК; (3) инкубацию протопластов в течение 20 часов; (4) выделение митохондрий из протопластов; (5) обработку ДНКазой; (6) экстракцию нуклеиновых кислот; (7) анализ импорта ДНК.

При постановке импорта ДНК в митохондрии протопластов арабидопсиса, было показано, что протопласты сохраняют структурную целостность после инкубации в течение 20 часов (рис. 3, а), препарат митохондрий, полученный из протопластов арабидопсиса, обладает высокой степенью очистки от хлДНК и яДНК (рис. 3, б и в). Импорт ДНК, проводимый в системе *in vivo*, обладает более высокой эффективностью в сравнении с импортом ДНК в изолированные органеллы (*in organello*) (рис. 3, г).

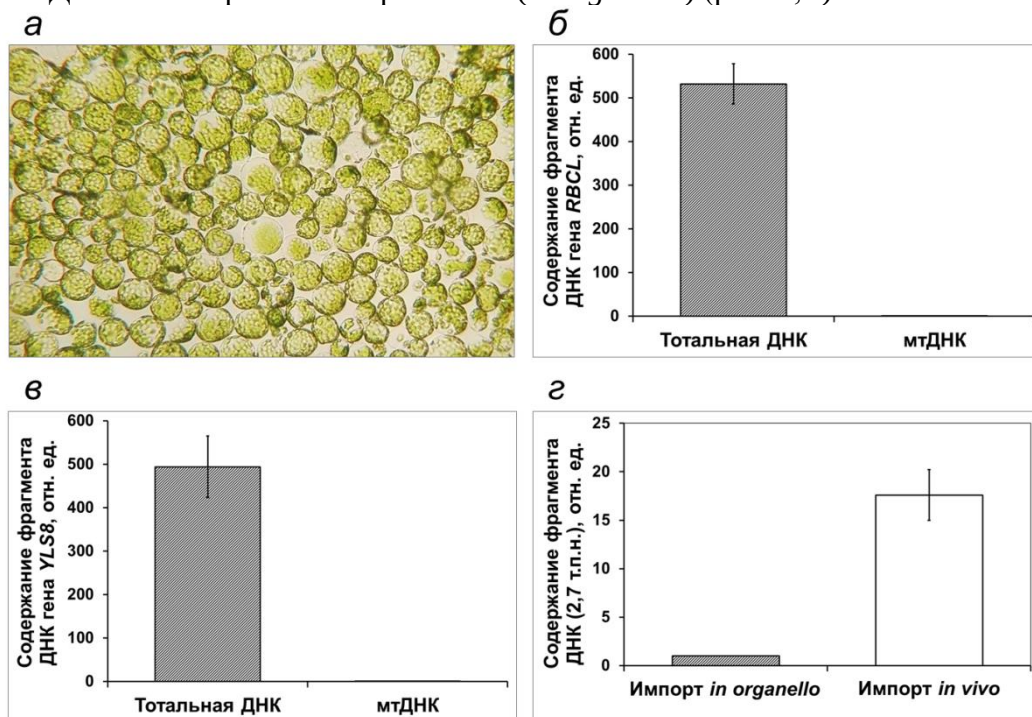


Рис. 3. Импорт ДНК в митохондрии протопластов арабидопсиса

а) Внешний облик протопластов арабидопсиса после трансформации фрагментом ДНК и инкубации в течение 20 ч; б) анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от хлоропластного загрязнения; в) анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от загрязнения ядерной ДНК. Показано относительное количество фрагментов генов *RBCL* (хлДНК) и *YLS8* (ядДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4* (мтДНК), выявленное при анализе проб ДНК, выделенной из тотального экстракта протопластов и из препарата изолированных митохондрий; г) анализ импорта ДНК в изолированных органеллах (*in organello*) и в протопластах (*in vivo*) арабидопсиса. На диаграммах количество мтДНК (б, в) и уровень импорта *in organello* (г) приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

С использованием обработки тритоном X-100 было показано, что детектируемый фрагмент локализован в матриксе митохондрий, а не ассоциирован с внешней мембраной (рис. 4, а). Проведение импорта ДНК разной длины *in vivo* показало, что эффективность импорта ДНК снижается в зависимости от длины импортируемого фрагмента (рис. 4, б).

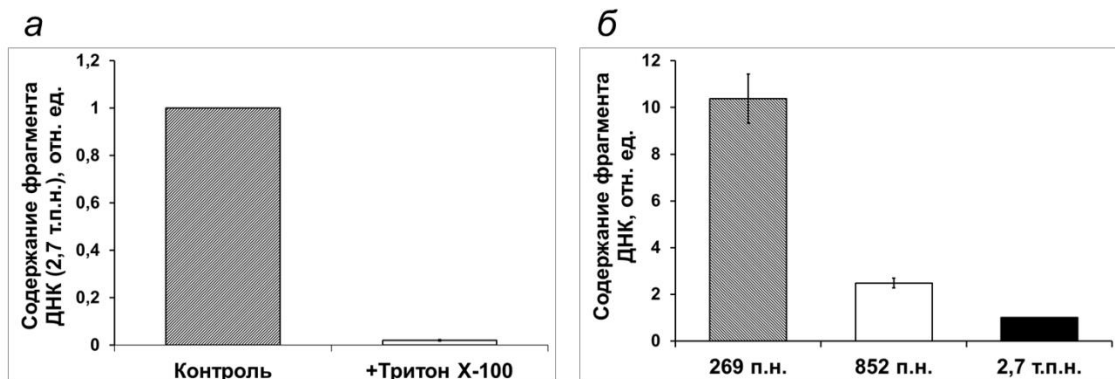


Рис. 4. Митохондриальный импорт ДНК *in vivo*, детектируемый (а) в условиях обработки митохондрий, выделенных из протопластов, детергентом Тритон X-100, и (б) в протопластах арабидопсиса с использованием ДНК различного размера

Показано относительное количество фрагмента гена *GFP* (содержащегося в импортированной ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. На диаграммах контроль (а) и уровень импорта 2,7 т.п.н. (б) приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Схожая зависимость была отмечена ранее для импорта фрагментов ДНК разного размера в изолированные митохондрии (Koulintchenko et al., 2003), что свидетельствует в пользу того, что обнаруженные нами закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*. Таким образом, нами впервые показано, что ДНК, находящаяся в цитоплазме целой растительной клетки, активно поступает в митохондрии.

В целом, по результатам проделанной работы, нами был разработан комплексный подход для изучения импорта ДНК в растительные митохондрии, включающий анализ в системах *in organello* и *in vivo* (рис. 5) (Tarasenko et al., 2019).

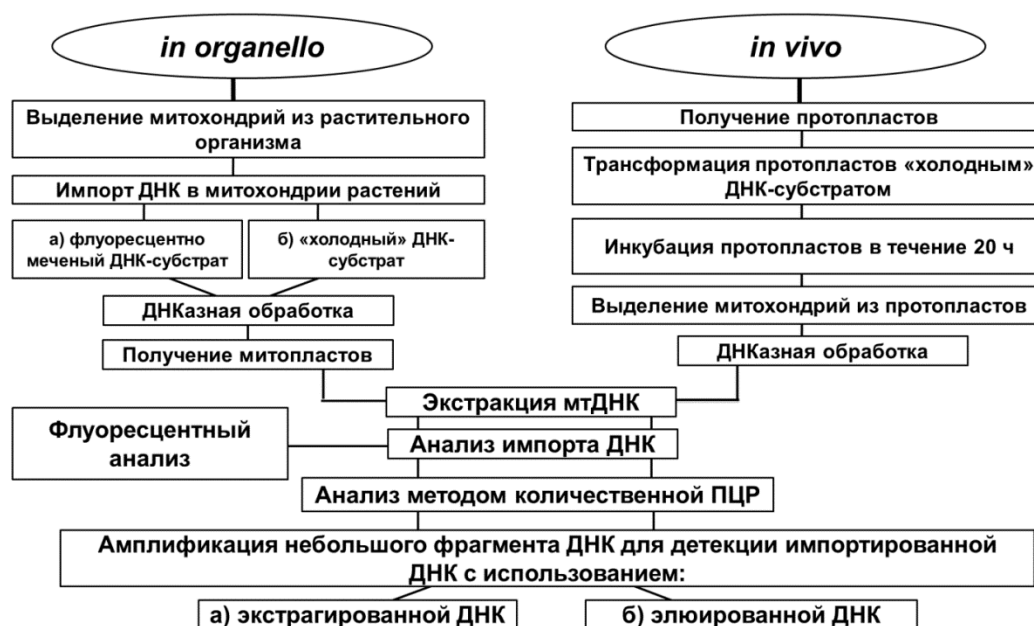


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая комплексный подход, основанный на использовании систем *in organello* и *in vivo*, для исследований импорта ДНК в растительные митохондрии

Данный подход позволит в дальнейшем выявить, сохраняются ли закономерности импорта ДНК, показанные ранее с использованием изолированных митохондрий, такие как: зависимость от размера и структурных особенностей молекулы ДНК, влияние на

интенсивность импорта инактивации определенных белков митохондриальной мембраны - на уровне целой растительной клетки. Помимо изучения механизмов переноса ДНК разработанный нами комплексный подход может быть использован в дальнейших исследованиях по поиску системы трансформации митохондриального генома растений.

Изучение кинетических характеристик импорта ДНК короткой и средней длины в растительные митохондрии

Концентрация субстрата – один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. У одних ферментов кривая имеет гиперболическую форму, у других - сигмоидную (рис. 6).

Ранее было показано, что работа переносчика адениннуклеотидов (АНТ) описывается в рамках кинетики работы фермента, имеющего один субстрат, и иллюстрируется сигмоидной кривой (рис. 6). В случае АНТ результатом субстрат-белкового взаимодействия является не продукт реакции, а перемещение в матрикс митохондрий (Scherer et al., 1973; Schultheiss et al., 1984).

Исходя из этого, мы предположили, что белки (АНТ и, вероятно, другие), формирующие мембранную пору для транспорта ДНК, имеют сайты с разным сродством не только к адениннуклеотидам, как это ранее показано, но в том числе и к ДНК.



Рис. 6. Типичная кривая зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, имеющая сигмоидную форму

Мы предполагаем, что характер поглощения ДНК в зависимости от ее концентрации будет различным в случае участия одного или нескольких мембранных каналов (рис. 7). Отсутствие насыщения процесса импорта будет говорить об отсутствии специфического транспортного пути. При условии, если импорт ДНК осуществляется только одним специфичным путем, кривая будет выходить на плато, указывая на насыщение процесса. В случае сложного характера механизма импорта ДНК в митохондрии, происходящего при участии нескольких транспортных путей, будет наблюдаться ступенчатое насыщение процесса.

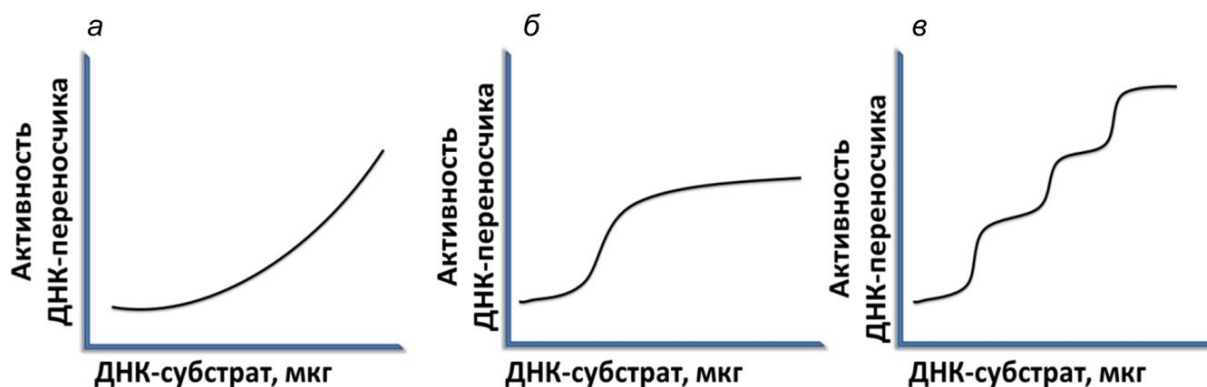


Рис. 7. Схематическое изображение типов кинетики импорта ДНК в митохондрии (зависимость активности импорта от концентрации ДНК)

- а) Отсутствие насыщения процесса, импорт ДНК не зависит от специфического транспортного пути; б) насыщение процесса, импорт ДНК осуществляется одним специфичным путем; в) ступенчатое насыщение процесса, импорт ДНК происходит при участии нескольких транспортных путей.

Эксперименты по изучению кинетических свойств импорта ДНК проводили с использованием изолированных митохондрий картофеля (рис. 8). При использовании для импорта фрагмента ДНК малой длины (269 п.н.) мы наблюдали практически полное отсутствие насыщения процесса по мере увеличения концентрации субстрата: количество поглощенной ДНК увеличивалось пропорционально количеству ДНК, добавленной в среду инкубации с митохондриями (рис. 8, а). В случае импорта фрагмента ДНК средней длины (2,7 т.п.н.) была выявлена ступенчатая зависимость процесса импорта ДНК от ее концентрации: кривая трижды выходила на плато, что указывает на вовлечение в процесс импорта дополнительных транспортных путей (рис. 8, б).

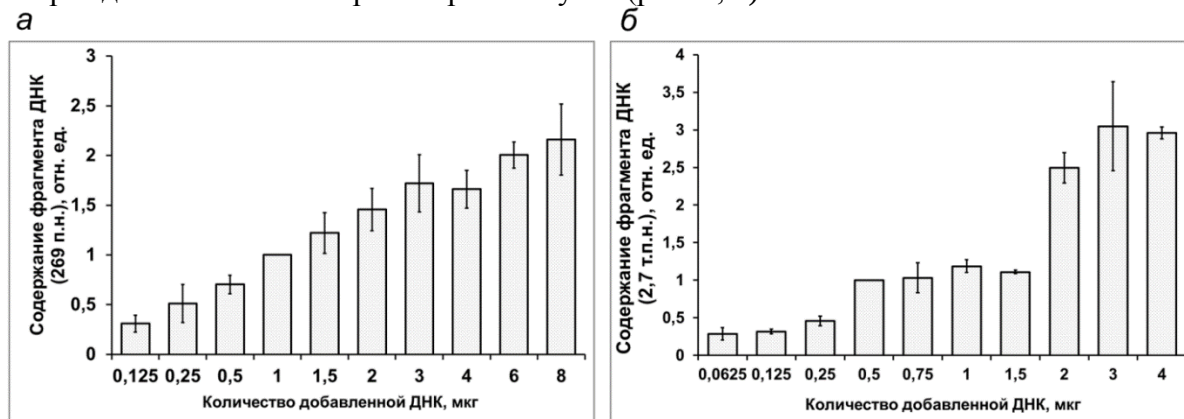


Рис. 8. Анализ кинетики импорта ДНК (а) малой, 269 п.н., или (б) средней, 2,7 т.п.н., длины в митохондрии *S. tuberosum* с использованием количественной ПЦР

Инкубацию ДНК (указано количество в каждой пробе) с митохондриями (100 мкг белка) проводили в течение 10 мин. МтДНК экстрагировали и анализировали с помощью ПЦР-РВ. Представлено содержание фрагмента гена *GFP*, нормированное на содержание эндогенного гена *NAD4*. Количество субстрата в пробах «1 мкг» (г) и «0,5 мкг» (д) для фрагментов 269 п.н. и 2,7 т.п.н., соответственно, принято за условную единицу. Представлены результаты не менее 10 биологических повторностей. Допуски на диаграмме представляют среднеквадратичные ошибки.

Таким образом, выявленная ступенчатая зависимость интенсивности поглощения митохондриями фрагментов средней длины (2,7 т.п.н.), но не малой длины (269 п.н.) от концентрации ДНК свидетельствует о существовании нескольких механизмов транспорта ДНК в митохондрии, зависящих от длины транспортируемых молекул.

Изучение роли мембранных белков митохондрий арабидопсиса в импорте ДНК разной длины

Для выполнения задачи по изучению роли кандидатных митохондриальных мембранных белков в транспорте ДНК в митохондрии нами была проведена подготовительная работа, включавшая этапы (1) заказа семян линий арабидопсиса, мутантных по избранным генам и получения гомозиготных растений этих линий, (2) фенотипической характеристики мутантных линий и последующего наращивания растительного материала, достаточного для постановки экспериментов. Таким образом нами были получены несколько гомозиготных линий арабидопсиса, названных *vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*, *tspo*, *drp3a*, *drp3b*, *om47* и *mic60*, в соответствии с обозначениями генов, инактивированных вставкой Т-ДНК. Фенотипические различия имели только три мутантных линии по изоформам митохондриального порина VDAC1, VDAC2 и VDAC4. Особенно выраженные различия с линией дикого типа показаны для изоформ VDAC2 и VDAC4.

Роль изоформ VDAC в импорте ДНК разной длины была исследована нами с помощью двух систем: *in organello* и *in vivo*. Для проведения исследований в системе *in organello* были использованы две мутантные линии, *vdac1* и *vdac3*, поскольку для этих линий, в отличие от частично стерильных линий *vdac2* и *vdac4*, оказалось возможным выращивать достаточное для выделения митохондрий количество растительного материала. Исходя из результатов сканирования флуоресценции и анализа в количественной ПЦР, митохондрии, выделенные из мутанта, характеризующегося отсутствием изоформы VDAC1, транспортировали ДНК с большей эффективностью в сравнении с митохондриями дикого типа (рис. 9, а, в). При этом, усиление активности митохондриального импорта у этого мутанта не выказало специфичности в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК: для всех четырех тестируемых субстратов (269 п.н., 852 п.н., 2,7 т.п.н. и 9 т.п.н.) мы наблюдали стимуляцию процесса. В противоположность этому, эффективность импорта в митохондрии дикого типа и мутантные по изоформе VDAC3, не различалась (рис. 9, б, г).

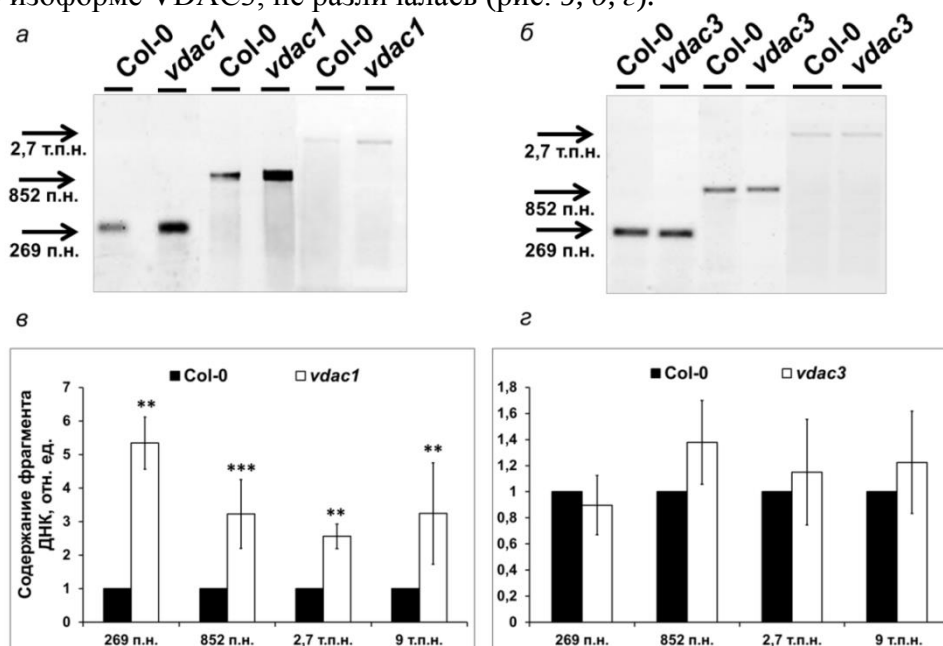


Рис. 9. Анализ импорта ДНК *in organello* в митохондрии арабидопсиса дикого типа (Col-0) и нокаут-мутантов по изоформам VDAC (*vdac1* и *vdac3*)

(а, б) Представлен результат анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК. Импорт ДНК размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. проводили в митохондриях, изолированных из проростков дикого типа (Col-0), нокаут-мутантов *vdac1* (в) и *vdac3* (г). Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare; (в, г) анализ импорта ДНК разной длины с использованием ПЦР-РВ. В митохондриях, изолированных из проростков дикого типа и мутантов *vdac1* и *vdac3*, проводили импорт фрагментов ДНК размером 269 п.н., 852 п.н., 2,7 т.п.н. и 9 т.п.н. После импорта митохондриальную ДНК экстрагировали и использовали для анализа в количественной ПЦР. На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее 5 независимых биологических повторностей. Уровень импорта экзогенного фрагмента ДНК в митохондрии арабидопсиса из линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения; ** – статистически значимые различия при $P \leq 0,01$ или 0,02, *** – при $P \leq 0,001$.

В экспериментах *in vivo* была исследована роль всех четырех изоформ VDAC (рис. 10). Результаты по импорту ДНК в митохондрии мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, полученные в системе *in organello*, были полностью подтверждены данными, полученными в экспериментах *in vivo*: происходила активация импорта в митохондрии, мутантные по белку VDAC1, а отсутствие изоформы VDAC3 не влияло на эффективность импорта. В случае отсутствия в митохондриальной мембране двух других изоформ VDAC2 и VDAC4 также была выявлена существенная активация процесса импорта ДНК, особенно выраженная при отсутствии изоформы VDAC2.

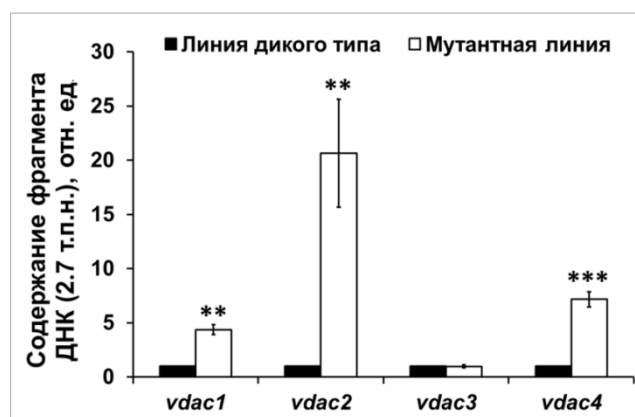


Рис. 10. Анализ импорта ДНК *in vivo* в митохондрии протопластов арабидопсиса дикого типа (Col-0) и нокаут-мутантов по изоформам VDAC (*vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*)

Протопласты трансформировали фрагментом ДНК размером 2,7 т.п.н. После инкубации в течение 20 ч и выделения митохондрий, мтДНК экстрагировали и использовали для анализа в количественной ПЦР (ПЦР-РВ). На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Уровень импорта фрагмента 2,7 т.п.н. в митохондрии арабидопсиса линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграмме представляют среднеквадратичные ошибки; ** – статистически значимые различия при $P \leq 0,01$ или 0,02, *** – при $P \leq 0,001$.

Исходя из имеющихся в нашем распоряжении фактов, а именно: (1) в импорте ДНК в митохондрии участвует белок внешней митохондриальной мембраны VDAC (Koulintchenko et al., 2003, 2006; Weber-Lotfi et al., 2009); (2) в митохондриях арабидопсиса присутствуют четыре функциональные изоформы VDAC (Tateda et al., 2011); (3) отсутствие изоформ VDAC1, VDAC2 и VDAC4 приводит к значительной активации импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса - мы решили проанализировать уровни экспрессии кодирующих изоформы VDAC генов в мутантных линиях арабидопсиса, у которых отсутствует одна из изоформ этого белка (рис. 11).

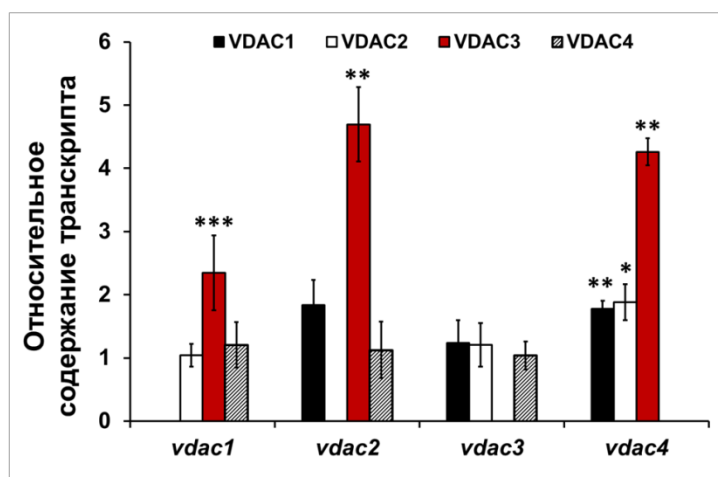


Рис. 11. Содержание транскриптов генов, кодирующих изоформы VDAC, в линиях арабидопсиса, мутантных по одной из его изоформ (*vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*)

Представлены данные трех биологических повторностей. Для нормализации был использован ядерный ген *YLS8*. Уровень транскрипта в линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения. * – статистически значимые различия при $P \leq 0,05$, ** – при $P \leq 0,01$ или 0,02, *** – при $P \leq 0,001$.

Продemonстрировано, что во всех мутантных линиях за исключением *vdac3* усилена экспрессия транскрипта изоформы VDAC3. Мы полагаем, что это может быть связано с

включением клеточного механизма, направленного на компенсацию недостающего транспортного белка митохондриальной мембраны. Однако эта активация неспособна компенсировать мутантный фенотип линий *vdac2* и *vdac4*, имеющих значительные нарушения в развитии и фертильности (Tateda et al., 2011; наши данные). Является ли VDAC3 искомым ключевым фактором импорта во внешней митохондриальной мембране, остается неясным. Против этого предположения свидетельствуют данные, показывающие отсутствие снижения интенсивности импорта ДНК в митохондриях мутанта *vdac3*.

Также нами было исследовано влияние инактивации ряда других белков митохондриальной мембраны на импорт ДНК *in organello* и *in vivo*. Митохондриальный бензодиазепиновый рецептор TSPO локализован в наружной митохондриальной мембране (Lindemann et al., 2004). В определенных ситуациях этот белок способен формировать временную пору в митохондриях животного происхождения (комплексы с порином и ANT в сайтах контакта двух мембран). Исходя из предположения о потенциальной способности растительного TSPO формировать комплексы с VDAC и ANT, одной из задач работы было проверить гипотезу об участии TSPO в импорте ДНК в митохондрии растений. Белок внешней мембраны OM47 был выбран нами ввиду его участия в транспорте метаболитических интермедиатов из и внутрь митохондрий (Li et al., 2016). Показано, что MIC60, локализованный во внутренней мембране митохондрий, является субъединицей митохондриального трансмембранного липопротеинового комплекса (МТЛ) и может потенциально участвовать в формировании межорганелльных контактных сайтов (Michaud et al., 2016). Белки DRP3A и DRP3B участвуют в процессах митохондриального деления, вызывая частичное изменение морфологии митохондрий, что предположительно могло иметь влияние на импорт ДНК в митохондрии (Fujimoto et al, 2009; Aung et al, 2012). Однако, несмотря на теоретически возможное вовлечение перечисленных белков в импорте ДНК, их влияния на этот процесс, в основном, не было выявлено. Мембранный белок TSPO может быть частью одного из механизмов импорта фрагментов средней длины в митохондрии арабидопсиса в условиях повышенных концентраций ДНК.

Исследование зависимости эффективности импорта ДНК от гетерогенности популяции митохондрий

При исследовании роли мембранных белков митохондрий в импорте ДНК с использованием растений арабидопсиса иногда в толще градиента перколла мы наблюдали разделение основного митохондриального слоя на два независимых банды, условно обозначенные нами верхней и нижней фракциями (рис. 12, а). Мы предположили, что, по всей видимости, имеем дело с митохондриальными субпопуляциями. Стоит отметить, что ранее для митохондрий арабидопсиса при разделении в градиенте плотности перколла не было показано существования митохондриальных субпопуляций. В этой работе были использованы также и два других растительных объекта.

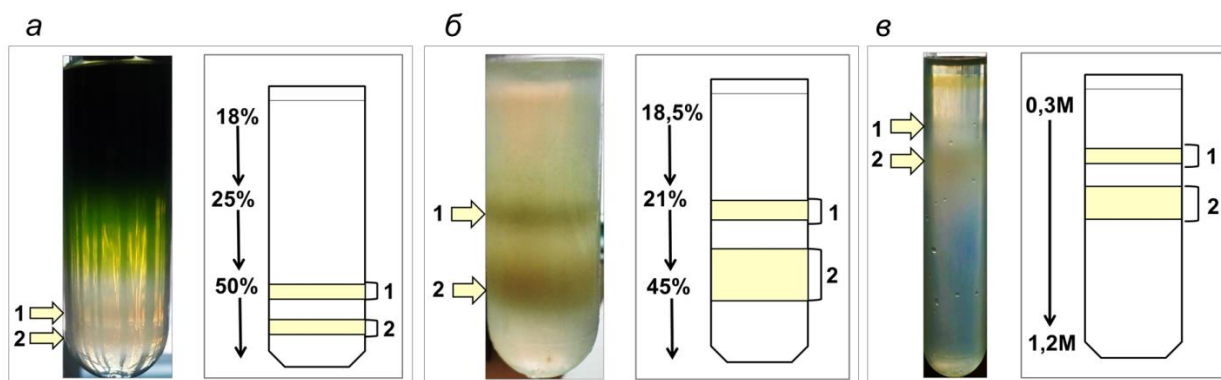


Рис. 12. Отбор митохондриальных фракций из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы и этиолированных проростков кукурузы

Представлено типичное разделение в ступенчатом градиенте перколла (а, б) митохондрий из *A. thaliana* (а), *B. rapa* (б) и в линейном градиенте сахарозы (в) митохондрий, выделенных из *Z. mays*; 1 – верхняя митохондриальная фракция, 2 – нижняя митохондриальная фракция.

Две фракции, верхняя и нижняя, были получены при разделении митохондрий (1) из корнеплодов репы (*Brassica rapa*) в ступенчатом градиенте плотности перколла, а также (2) из этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays*) в линейном градиенте сахарозы (рис. 12, б и в).

Из литературных источников известно, что митохондриальная популяция обладает гетерогенностью. Согласно этим данным, параметры, по которым характеризуют субпопуляции, включают геномную гетерогенность, структурно-морфологические различия, плотность и размер органелл, межорганелльные взаимодействия, величину дыхательного контроля, трансмембранный потенциал и другие.

Нами было проведено исследование особенностей импорта ДНК в митохондриальные фракции арабидопсиса, репы и кукурузы (рис. 13). Показано, что митохондрии верхней фракции всех растительных источников более эффективно импортируют ДНК по сравнению с митохондриями нижней фракции (рис. 13, а). Содержание мтДНК в верхней и нижней митохондриальных фракциях арабидопсиса, репы и кукурузы не различалось (рис. 13, б).

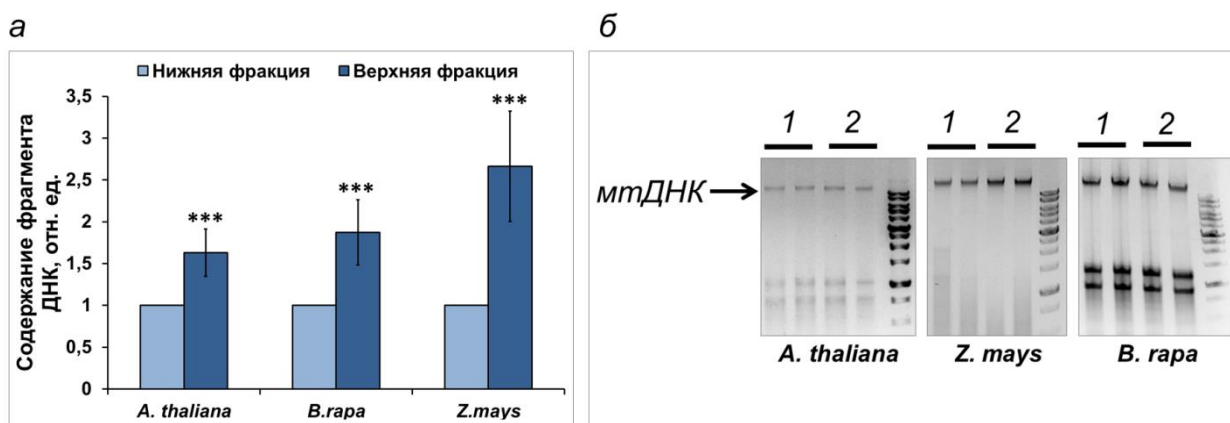


Рис. 13. Качественный и количественный анализ мтДНК, экстрагированной после импорта ДНК разной длины в митохондрии различных фракций

а) Эффективность импорта ДНК во фракции митохондрий *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Количество импортированной ДНК нормировали к количеству эндогенной ДНК, митохондриальному гену *NAD4*. Эффективность импорта ДНК в нижнюю митохондриальную фракцию принята за условную единицу. Данные представлены по результатам не менее 8 биологических повторностей. Допуски на диаграммах представляют стандартные отклонения; *** – статистически значимые различия при $P \leq 0,001$; б) анализ качества митохондриальной ДНК, экстрагированной после импорта ДНК в нижнюю (1) и верхнюю (2) митохондриальные фракции *A. thaliana*, *B. rapa*, *Z. mays*.

Известно, что митохондрии двух разных субпопуляций могут обладать морфологическими и структурными различиями (Lund et al., 1958; Bakeeva et al., 1999; Logan et al., 2001; Logan, 2006; Бегунова и Векшин, 2015). С целью выявления особенностей морфологического строения митохондриальных фракций, выделенных из репы и кукурузы, мы провели анализ нескольких митохондриальных проб (не менее трех для одного вида) с помощью электронной микроскопии. На рисунке 14 представлены результаты, демонстрирующие структурные особенности митохондрий нижней или верхней фракций. Для митохондрий верхней митохондриальной фракции (рис. 14, б и в) можно отметить отсутствие четко сформированной структуры крист в отличие от митохондрий нижней фракции (рис. 14, а и в), в составе которой подобная структура встречалась существенно реже. Эта особенность была в большей степени характерна для препаратов митохондрий верхней фракции кукурузы (рис. 14, в) по сравнению с митохондриальными препаратами верхней фракции репы (рис. 14, б).

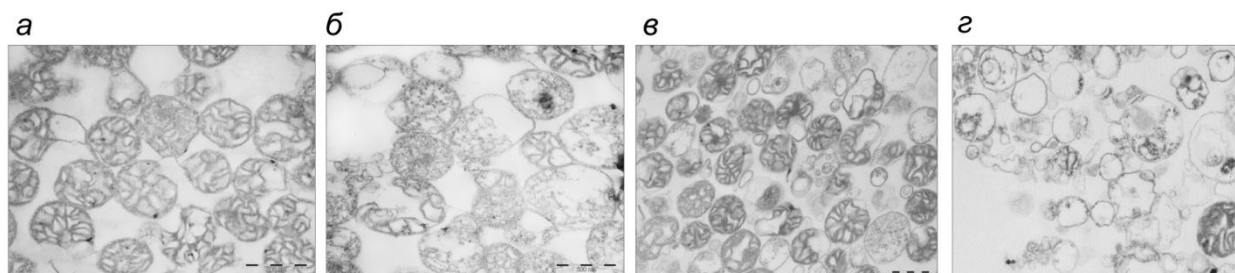


Рис. 14. Электронная микроскопия митохондриальных фракций репы (*B. rapa*) и кукурузы (*Z. mays*)

Представлены результаты микроскопического исследования нижней (а, в) и верхней (б, г) митохондриальных фракций *B. rapa* (а, б) и *Z. mays* (в, г). Масштаб: 500 нм.

При изучении дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных нами из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы и этиолированных проростков кукурузы, показано, что все изучаемые фракции поглощали кислород и характеризовались сопряжением дыхания и фосфорилирования. При добавлении протонофора СССР (карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон) во всех тестируемых митохондриальных фракциях происходило разобщение дыхания и фосфорилирования. Абсолютные величины дыхательного контроля (ДК) митохондриальных фракций арабидопсиса составили 1,76 (верхняя фракция) и 1,58 (нижняя фракция), для кукурузы эти показатели были равны 2,23 для верхней фракции митохондрий и 2,64 для нижней. Наиболее высоким сопряжением обладали митохондриальные фракции репы: 2,57 и 2,99 для верхней и нижней фракций, соответственно. В таблице 2 приведены результаты оценки относительных величин дыхательного контроля и интактности нижней (1) и верхней (2) митохондриальных фракций *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Статистически значимыми различиями по величине дыхательного контроля между верхней и нижней фракциями обладали митохондрии всех исследуемых видов (табл. 2). Наименьшим снижением показателя ДК по сравнению с нижней фракцией обладали митохондрии верхней фракции, выделенные из проростков арабидопсиса (на 11 %). Наибольшее снижение было отмечено для митохондрий верхней фракции кукурузы (на 19 %), что не удивительно, принимая во внимание структурные особенности части митохондрий этой фракции (см. рис. 14, г). Ранее было показано, что митохондрии, находящиеся в нижних слоях градиента, зачастую имеют более высокий дыхательный контроль (Lund et al., 1958; Nishimura et al., 1982; Dai et al., 1998; Petrucci et al., 2008), чем митохондрии верхних слоев градиента. При этом интактность митохондриальных препаратов верхней и нижней фракций не отличалась для всех растительных объектов, и имела достаточно высокий показатель (80-90 %) (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика митохондриальных фракций разных растительных видов

Вид растения	Коэффициент ДК		Р	Интактность внешней мембраны		Уровень импорта		Р
	1	2		1	2	1	2	
<i>A. thaliana</i>	100 %	89 %	≤0,02**	75-80 %		100 %	163 %	≤0,001***
<i>B. rapa</i>	100 %	84 %	≤0,02**	80-85 %		100 %	187 %	≤0,001***
<i>Z. mays</i>	100 %	81 %	≤0,05*	80-90 %		100 %	266 %	≤0,001***

Представлены относительные величины коэффициента дыхательного контроля (ДК), интактности и уровня импорта митохондриальных фракций, выделенных из *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Представлены данные не менее трех (величина ДК) и восьми (уровень импорта) независимых биологических повторностей. Примечание: 1 – митохондрии нижней фракции, 2 – митохондрии верхней фракции; Р – уровень значимости различий между верхней и нижней фракциями; *, **, *** - статистически значимые различия.

При проведении электрофореза митохондриальных белков в полиакриламидном геле и определения активности дыхательных комплексов методом BN-PAGE, а также измерении активности сукцинатдегидрогеназы существенных различий между двумя фракциями митохондрий репы и кукурузы не обнаружено.

Исходя из совокупности полученных нами данных, очевидно, что митохондрии, выделяемые из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы или этиолированных проростков кукурузы, представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую, как минимум, из двух митохондриальных субпопуляций. При выделении митохондрий эти субпопуляции располагаются в различных слоях градиента плотности. Мы полагаем, что усиление эффективности импорта в митохондрии верхней фракции не связано со снижением их интактности, поскольку этот показатель был достаточно высоким для митохондрий обеих фракций (табл. 2). Тем не менее, нижняя митохондриальная фракция имела в своем составе, наряду с типичными митохондриями, органеллы со слабо развитой системой крист (рис. 14) и характеризовалась некоторым снижением дыхательной активности по сравнению с нижней фракцией (табл. 2). Вероятно, эффективность импорта ДНК в значительной степени определяется структурной организацией двойной митохондриальной мембраны, которая в свою очередь существенно зависит от качества и степени зрелости внутренней мембраны. Можно предположить, что нижняя фракция митохондрий содержит более зрелые митохондрии, а верхняя – митохондрии на разных стадиях созревания, а расположение этих фракций в градиенте плотности будет отражать в некотором роде степень их структурных различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены принципиально новые данные о факторах транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в процессе импорта ДНК. Ранее было показано, что импорт ДНК происходит с участием порина (VDAC) во внешней и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) во внутренней мембранах митохондрий (Koulintchenko et al., 2003), однако этот процесс не ограничивается участием этих двух мембранных белков и, по всей видимости, происходит посредством нескольких альтернативных механизмов при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015). Исходя из этого, мы предположили, что активность процесса импорта ДНК может не только зависеть от функционирования специфических ДНК-переносчиков, которые еще предстоит идентифицировать, но и иметь сложную кинетическую зависимость от концентрации ДНК-субстрата, а также меняться в зависимости от метаболического состояния митохондрий в клетке. В свою очередь, метаболическое состояние митохондрий также может вносить вклад в характер процесса импорта ДНК ввиду того, что митохондриальная популяция часто представляет смесь неоднородных органелл, отличающихся по своим структурно-функциональным свойствам (Lund et al., 1958; Bakeeva et al., 1999; Logan et al., 2001; Logan, 2006; Бегунова и Векшин, 2015). В силу вышесказанного, в рамках данной работы была предпринята попытка приблизиться к пониманию механизма импорта ДНК, его закономерностей и факторов, влияющих на этот процесс. Для этого нами были исследованы особенности транспортной системы, участвующей в импорте ДНК в растительные митохондрии, включающие (1) кинетическую закономерность протекания процесса импорта ДНК разной длины, (2) участие ряда потенциальных белков-переносчиков митохондриальной мембраны и (3) зависимость процесса переноса ДНК внутрь митохондрий от структурно-функциональных особенностей субпопуляций этих органелл.

При изучении концентрационной зависимости импорта молекул ДНК разной длины в митохондрии картофеля был продемонстрирован разный характер этого кинетического параметра для фрагментов ДНК двух размерных классов. Для ДНК-субстратов малой длины показано отсутствие существования специфического переносчика ввиду того, что кинетика импорта субстрата этого размерного класса имела линейную зависимость без выхода на плато. В противоположность этому, для субстратов ДНК средней длины был характерен ступенчатый характер зависимости интенсивности импорта от концентрации ДНК, что говорит в пользу высказанной ранее гипотезы о существовании множественных механизмов импорта (Weber-

Lotfi et al., 2015): при каждом выходе кривой на плато, по всей видимости, происходит насыщение одного из транспортных путей и появление возможности подключения другого механизма. Кривая зависимости импорта ДНК средней длины от ее концентрации трижды выходила на плато, позволяя предположить участие в этом процессе как минимум трех транспортных путей.

С целью поиска специфичного переносчика молекул ДНК через митохондриальную мембрану, нами был исследован импорт ДНК в нокаут-мутантах арабидопсиса по белкам, имеющим потенциальную способность участвовать или оказывать влияние на этот процесс: белкам внешней мембраны TSPO, OM47, DRP3A и DRP3B, изоформам VDAC и белку внутренней митохондриальной мембраны MIC60.

Показано, что OM47, MIC60, DRP3A и DRP3B не принимают непосредственного участия в импорте ДНК. Для TSPO показано включение в процесс импорта в условиях повышенных концентраций ДНК среднего размера, что, возможно, имеет связь с показанной нами кинетикой импорта ДНК-субстратов средней длины. В отношении четырех изоформ порина только для VDAC1, VDAC2 и VDAC4 показана зависимость процесса импорта ДНК от наличия или отсутствия этих белков в митохондриальной мембране. Эта зависимость, однако, оказалась обратной - наблюдалась стимуляция импорта в мутантных по этим белкам линиях. При этом эти три мутантные линии имели фенотип, отличающийся от фенотипа линии дикого типа, причем наименьшие отличия выказывала линия *vdac1*, а наибольшие – линия *vdac2*. Интересно отметить, что чем важнее для клетки функция изоформы порина, тем сильнее выражена стимуляция импорта ДНК в митохондрии, характеризующиеся ее отсутствием. Мы предполагаем, что отсутствие одной из изоформ порина может компенсироваться повышением экспрессии других его изоформ, что косвенно подтверждается полученным нами результатом, показывающим повышение уровня транскрипции гена, кодирующего изоформу VDAC3, в линиях *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*. Известно, что порины играют важную роль в импорте тРНК и различных метаболитов, поэтому возрастание содержания других изоформ порина может объясняться повышенной потребностью обеспечить митохондрию полным набором тРНК.

Другая наша гипотеза, объясняющая стимулирующий эффект отсутствия одной из изоформ VDAC на импорт ДНК, берет за основу электрофизиологическое функционирование митохондриальных поринов. Дело в том, что проводимость VDAC строго зависит от мембранного потенциала, и формируемый им канал может находиться в открытом или закрытом состоянии (Kusano et al., 2009), тем самым регулируя поток метаболитов в митохондрию. Электрофизиологические исследования белков VDAC из разных видов с использованием искусственных липидных бислоев выявили следующую закономерность: эти белки образуют высокопроводящие анион-селективные каналы, которые открыты при низких мембранных потенциалах. Выше определенного значения (20–30 мВ), положительного или отрицательного, потенциала мембраны, каналы имеют тенденцию переключаться в состояния с низкой проводимостью, которые являются катион-селективными (Benz, 1994; Colombini et al., 1996).

В работе Tateda et al. (2011) было показано, что во всех мутантных линиях *vdac* значения мембранного потенциала митохондрий были ниже, чем у линий дикого типа, причем отсутствие VDAC2 или VDAC4 приводили к большей потере мембранного потенциала митохондрий, чем отсутствие VDAC1 или VDAC3. Эти данные, возможно, объясняют показанный в рамках нашей работы эффект усиления импорта ДНК в митохондрии, в мембране которых отсутствует одна из изоформ VDAC: как было отмечено выше, снижение мембранного потенциала митохондрий приводит к открытию поры, формируемой при участии порина, и осуществлению анион-транспортной функции VDAC. Однако, это не объясняло бы отсутствие эффекта стимуляции импорта ДНК в митохондрии мутантной линии *vdac3*. Как оказалось, все каналы, формируемые изоформами VDAC, обладают разными проводящими свойствами, что было показано на митохондриях животных и дрожжей (Xu et al., 1999). При этом, VDAC1 и VDAC2 обладают высокой проводимостью и способностью открывать канал при высоком мембранном потенциале, в то время как у VDAC3, напротив, эти характеристики низкие (Colombini et al., 1996). Исходя из этого, можно предположить, что в первую очередь именно VDAC3 отвечает за

открытие поры при снижении мембранного потенциала в мутантных линиях изоформ VDAC. С учетом полученных нами данных о повышенной экспрессии VDAC3 в мутантных линиях *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*, мы предполагаем, что эффект активации импорта ДНК связан с открытым состоянием увеличенного количества VDAC3 во внешней митохондриальной мембране, вызванным снижением мембранного потенциала митохондрий в этих линиях (Tateda et al., 2011).

При изучении возможного влияния структурно-функциональных особенностей митохондриальных субпопуляций различных растительных объектов (*A. thaliana*, *B. rapa*, *Z. mays*) на процесс импорта ДНК, нами продемонстрировано, что та субпопуляция, которая образовывала в градиенте плотности отдельный банд, стабильно локализующийся выше основного слоя митохондрий, обладала повышенной способностью к поглощению экзогенной ДНК. Эта субпопуляция характеризовалась измененной или плохо развитой системой внутренних мембран и некоторым снижением величины дыхательного контроля. Мы полагаем, что эта субпопуляция содержит менее зрелые митохондрии, повышенная способность которых к импорту ДНК связана, скорее всего, со структурными особенностями мембраны этих органелл.

Важным результатом нашей работы стала разработка нового подхода для изучения импорта ДНК в системе *in vivo*, с активным привлечением которого проводилась большая часть наших исследований при использовании растений арабидопсиса. В результате установлено, что фрагменты ДНК размером 270–2700 п.н., трансфицированные в протопласты, импортируются из цитоплазмы в митохондрии с достаточно высокой интенсивностью. Помимо изучения механизмов переноса ДНК *in vivo*, данный подход может быть использован при разработке системы трансформации митохондриального генома растений. Подобная система может включать трансфекцию протопластов конструкциями, содержащими последовательности, обеспечивающие встраивание в мт-геном (Mileshina et al., 2011) и транскрипцию целевых последовательностей (Koulintchenko et al., 2003), регенерацию клеточной стенки, селективный отбор трансформированных клеток и получение из них целых растений.

ВЫВОДЫ

На основании результатов проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Показано, что при трансформации протопластов арабидопсиса в системе *in vivo*, ДНК активно поступает из цитоплазмы в митохондрии. Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях в системе изолированных митохондрий, сохраняются *in vivo*.
2. Выявлена ступенчатая зависимость интенсивности поглощения митохондриями фрагментов средней длины (2,7 т.п.н.), но не малой длины (269 п.н.) от концентрации ДНК. Полученный результат свидетельствует о множественных механизмах транспорта ДНК в митохондрии, зависящих от длины транспортируемых молекул.
3. С использованием инсерционных мутантов арабидопсиса, у которых инактивирована одна из изоформ митохондриального порина, показано, что отсутствие VDAC1, VDAC2 или VDAC4 приводит к существенной стимуляции процесса импорта ДНК в митохондрии. Отсутствие изоформы VDAC3 влияния на митохондриальный импорт ДНК не оказывает. При этом, зависимости активности импорта в митохондрии линий, мутантных по любой из четырех изоформ, от длины импортируемой молекулы не выявлено. Показано, что отсутствие одной из изоформ в мутантных линиях *vdac1*, *vdac2* или *vdac4* приводит к усилению экспрессии VDAC3. На основании полученных результатов, мы предполагаем, что импорт ДНК в растительные митохондрии зависит как от свойств проводимости митохондриальной мембраны, так и от структурных перестроек, по-разному обеспечиваемых изоформами VDAC.
4. С использованием инсерционных мутантов арабидопсиса показано, что отсутствие белков, предположительно участвующих в транспорте метаболитов в митохондрии (OM47), в формировании контактных сайтов с митохондриальной мембраной (MIC60),

в процессах деления митохондрий (DRP3A или DRP3B), не влияют на процесс импорта ДНК в растительные митохондрии. Мембранный белок TSPO может быть частью одного из механизмов импорта фрагментов средней длины в митохондрии арабидопсиса в условиях повышенных концентраций ДНК в среде инкубации.

5. Митохондрии, выделяемые из различных растительных организмов, представляют собой гетерогенную популяцию, содержащую, по всей видимости, органеллы на разных стадиях созревания. Менее зрелые митохондрии обладают более выраженной способностью к импорту ДНК. Эта способность связана, скорее всего, со структурными особенностями митохондриальной мембраны.

Список работ, опубликованных Тарасенко (Болотовой) Татьяной Андреевной по теме диссертационной работы:

1. Konstantinov Y. M. DNA import into mitochondria / Y.M. Konstantinov, A. Dietrich, F. Weber-Lotfi, N. Ibrahim, E.S. Klimenko, V.I. Tarasenko, **T.A. Bolotova** and M.V. Koulintchenko // Biochemistry (Moscow). – 2016. – V. 81, 1044-1056. doi: 10.1134/S0006297916100035.
2. **Bolotova T.** Study of factors determining the mechanism DNA import into plant mitochondria in organelle and in vivo / **T. Bolotova**, V. Tarasenko, E. Klimenko, M. Koulintchenko, F. Weber-Lotfi, A. Dietrich, Y. Konstantinov // ICPMB 2017 10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Hangzhou, China, May 22-27, 2017). – Hangzhou, China. – P. 48.
3. Koulintchenko M. Import of DNA of various length and structure into plant mitochondria can be carried out by more than one mechanism / M. Koulintchenko, **T. Bolotova**, V. Tarasenko, E. Klimenko, V. Chernikova, F. Weber-Lotfi, A. Dietrich, Y. Konstantinov // ICPMB 2017 10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Hangzhou, China, May 22-27, 2017). – Hangzhou, China. – P. 91.
4. Константинов Ю. М. Импорт ДНК и нестабильность митохондриального генома высших растений: эволюционно-генетические и прикладные аспекты / Ю. М. Константинов, М. В. Кулинченко, Е. С. Клименко, **Т. А. Болотова**, В. И. Тарасенко, В. Н. Шмаков, В. И. Бельков, В. В. Черникова, Ф. Вебер-Лотфи, А. Дитриш // Беляевские чтения. Международная конференция, посвященная 110-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева (Новосибирск, 7-10 августа 2017 г.): тезисы докладов. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН. – 2017. – С. 205.
5. **Болотова Т. А.** Изучение роли мембранных белков в митохондриях арабидопсиса в импорте ДНК / **Т. А. Болотова**, В. И. Тарасенко, Ю. М. Константинов, М. В. Кулинченко // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки : Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22–24 мая 2018 г.). Изд-во Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – С. 14-16. doi: 10.31255/978-5-94797-318-1-14-16.
6. Клименко Е. С. Изучение роли взаимодействия мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума в импорте ДНК / Е. С. Клименко, В. Н. Шмаков, **Т. А. Болотова**, И. Ю. Субота, В. И. Тарасенко, М. В. Кулинченко, Ю. М. Константинов // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки : Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22-24 мая 2018 г.). Изд-во Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – С. 49-51. doi: 10.31255/978-5-94797-318-1-49-51.
7. Константинов Ю. М. Изучение факторов импорта ДНК в митохондрии растений / Ю. М. Константинов, М. В. Кулинченко, Е. С. Клименко, **Т. А. Болотова**, В. И. Тарасенко, В. Н. Шмаков // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки : Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22-24 мая 2018 г.). Изд-во

- Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – С. 55-57. doi: 10.31255/978-5-94797-318-1-55-57.
8. Субота И. Ю. Изучение взаимосвязи морфологических и функциональных различий популяции митохондрий высших растений с их специализацией при выполнении биоэнергетических и адаптивных функций / И. Ю. Субота, М. В. Кулинченко, **Т. А. Болотова**, Ю. М. Константинов // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки : Материалы докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22-24 мая 2018 г.). Изд-во Института географии им. В. Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – С. 127-129. doi: 10.31255/978-5-94797-318-1-127-129.
 9. **Болотова Т. А.** Изучение гетерогенности структурной и функциональной организации популяции митохондрий высших растений / **Т. А. Болотова**, И. Ю. Субота, В. И. Тарасенко, Ю. М. Константинов, М. В. Кулинченко // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды : Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. II. – С. 1191-1194. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-1191-1194.
 10. Клименко Е. С. Изучение импорта ДНК в митохондрии растений методом реконструкции / Е. С. Клименко, В. Н. Шмаков, **Т. А. Болотова**, И. Ю. Субота, В. И. Тарасенко, М. В. Кулинченко, Ю. М. Константинов // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. II. – С. 1272-1275. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-1272-1275.
 11. Константинов Ю. М. Изучение импорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений / Ю. М. Константинов, **Т. А. Болотова**, A. Dietrich, F. Weber-Lotfi, М. В. Кулинченко // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. II. – С. 1276-1279. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-1276-1279.
 12. Тарасенко В. И. Исследование импорта ДНК в митохондрии *in vivo* с использованием протопластов арабидопсиса / В. И. Тарасенко, **Т. А. Болотова**, М. В. Кулинченко, Ю. М. Константинов // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. II. – С. 1385-1387. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-1385-1387.
 13. **Tarasenko T. A.** DNA import into plant mitochondria: complex approach for in organello and in vivo studies / **T. A. Tarasenko**, V. I. Tarasenko, M. V. Koulintchenko [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2019. – V. 84(7). – P. 817-828. doi: 10.1134/S0006297919070113.